



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	乙第1877号
学位記番号	論 第1649号
氏 名	土肥 名月
授与年月日	平成 29 年 3 月 24 日
学位論文の題名	<p>Aberrant activation pathway for EZH2 by IKK-ϵ-NF-κB in colorectal cancer</p> <p>（大腸がんにおいては IKK-ϵ を介する NF-κB 経路により EZH2 の異常な活性化が誘導される）</p> <p>Nagoya Medical Journal accept for publication, 2017</p>
論文審査担当者	<p>主査： 岡本 尚</p> <p>副査： 竹山 廣光，近藤 豊</p>

ポリコーム複合体 (Polycomb repressive complex 2, PRC2)はエピゲノム修飾の1つであるヒストン H3-27 番リジン残基(H3K27)をトリメチル化することにより、細胞の発生・分化に必要な遺伝子の発現を調節する。PRC2 の構成タンパク質である Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2)はヒストンメチル化酵素活性をもち、PRC2 の中心的な分子である。

今までに前立腺がん、乳がん、大腸がんの他、様々ながんにおいて EZH2 の過剰発現と悪性度との関連が示唆されている。EZH2 の過剰発現に関わるメカニズムはいくつか報告があり、例えば転写因子 E2F1 やリン酸化 ELK1 ががん細胞で活性化し、EZH2 の発現を上昇させる。しかし EZH2 の過剰発現に関わるメカニズムはそれ以外にも存在する可能性が高くその全容は必ずしも十分に理解されていない。近年、細胞外からの増殖シグナルがリプログラミングを制御していることが分かってきた。特にリン酸化シグナルがエピゲノム制御と深く関与することが示されている。そこで我々はがん細胞において EZH2 の過剰発現に関わるリン酸化シグナルの同定を試みた。

EZH2 遺伝子の発現制御に関わる領域を含む転写開始点から上流-3183~+1238 領域下流にレポーター遺伝子を組み込んだコンストラクトを大腸がん細胞株 RKO で発現させ、既知ヒトリン酸化酵素 709 種を標的とする siRNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。

レポーターアッセイで EZH2 の発現を抑制した 181 候補遺伝子を、公共データベース TCGA (The Cancer Genome Atlas) を用いて解析し、大腸がんが発現が亢進している 41 種のリン酸化酵素を同定した。その中で siRNA で発現抑制率の最も高かった I-Kappa-B Kinase Epsilon (IKK-ε)を同定した。

IKK-ε は NF-κB シグナル経路内のリン酸化酵素の1つである。IKK-ε をコードする *IKBKE* 遺伝子は、大腸がん細胞株 RKO、SW480 で正常線維芽細胞株 WI-38 に比較し有意に高発現していた ($P<0.01$)。更に *IKBKE* を標的とする 3 種の異なる siRNA を用いて RKO、SW480 細胞でノックダウンを行った結果、すべてにおいて EZH2 の mRNA、蛋白質量を抑制した。IKK-ε ホモログ TANK Binding Kinase 1 (TBK1) は、IKK-ε とヘテロダイマーを形成し RelA/p65 をリン酸化して NF-κB 経路を活性化することが知られている。siRNA を用いて *TBK1* をノックダウンすると、EZH2 の mRNA、蛋白質量を抑制した。一方で *IKBKE*、*TBK1* 遺伝子のノックダウンで E2F1 の蛋白質量は変化がみられず、IKK-ε による EZH2 調節機構は E2F1 活性とは独立した経路であると示唆された。IKK-ε、TBK1 とともに阻害する BX795 は RelA/p65 のリン酸化を抑制し NF-κB 経路を阻害する。BX795 (25μM) 処理においても EZH2 の発現抑制を認めた。

IKK-ε 抑制による細胞増殖への影響について検討を行った結果、IKK-ε に対する siRNA 処理により SW480 細胞 ($P=0.02$)と RKO 細胞で増殖抑制効果を認めた。また BX795 処理では SW480 細胞、RKO 細胞において著明な増殖抑制を認めた ($P<0.01$)。

次に臨床検体において大腸がん部と同一患者由来の正常大腸粘膜 (n=50) の *IKBKE*、*EZH2* 遺伝子発現の検討を行った。両者は大腸がん組織で、強い相関 ($r=0.6081$) が見られた。

本研究から、大腸がんにおいて IKK-ε を介する NF-κB 経路が EZH2 の過剰発現に寄与していることを見出した。NF-κB 経路はがん細胞の増殖、維持などに関与しており、メラノーマでは NF-κB2 が EZH2 過剰発現を誘導し腫瘍形成に寄与していることが報告されている。また乳がん症例の約 30%で *IKBKE* の遺伝子増幅が存在し、IKK-ε が外来刺激によらず活性化され NF-κB 経路の活性化を介した細胞増殖に関与していると報告されている。近年メチル化酵素活性を標的とした EZH2 阻害剤が開発され、特に EZH2 遺伝子変異を有するがん細胞で細胞増殖抑制効果を示す。一方で EZH2 にはメチル化酵素活性に依存せず遺伝子発現制御を行い発がんに関与する機構も報告されており、H3K27me3 の抑制ではなく EZH2 発現を制御することが、がん治療に必要となる可能性が考えら

れる。IKK-ε ならびに EZH2 の発現は多くの大腸がんで増加しており、本研究で見出した IKK-ε を標的とした治療法が、今後新たながん治療法として期待できると考える。

論文審査の結果の要旨

【発表の内容】

ポリコーム複合体 (Polycomb repressive complex 2, PRC2) はエピゲノム修飾の1つであるヒストン H3-27 番リジン残基 (H3K27) をトリメチル化することにより、細胞の発生・分化に必要な遺伝子の発現を調節する。PRC2 の構成タンパク質である Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) はヒストンメチル化酵素活性をもち、PRC2 の中心的な分子である。

これまでに前立腺がん、乳がん、大腸がんの他、様々ながんにおいて EZH2 の過剰発現と悪性度との関連が示唆されているが、EZH2 の過剰発現に関わるメカニズムについての全容は必ずしも明らかでない。一方で EZH2 の過剰発現にはリン酸化酵素の関与が示唆されていることから、本研究では大腸がん細胞において EZH2 の過剰発現に関わるリン酸化シグナルの同定を行った。

EZH2 遺伝子の発現制御に関わる領域を組み込んだコンストラクトを大腸がん細胞株 RKO で発現させ、既知ヒトリン酸化酵素 709 種を標的とする siRNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。レポーターアッセイで EZH2 発現を抑制し、公共データベース TCGA (The Cancer Genome Atlas) より大腸がんで発現が亢進していた 41 種のリン酸化酵素の中から、siRNA で発現抑制率の最も高かった I-Kappa-B Kinase Epsilon (IKK-ε) を同定した。

IKK-ε は NF-κB シグナル経路内のリン酸化酵素の1つである。IKK-ε をコードする *IKBKE* 遺伝子は、大腸がん細胞株 RKO、SW480 で正常線維芽細胞株 WI-38 に比較し有意に高発現していた ($P<0.01$)。 *IKBKE* を標的とする3種の異なる siRNA を用いてノックダウンを行った結果、すべてにおいて EZH2 の mRNA、蛋白質量を抑制した。IKK-ε ホモログ TANK Binding Kinase 1 (TBK1) のノックダウンによっても、EZH2 の mRNA、蛋白質量を抑制した。IKK-ε、TBK1 とともに阻害する BX795(25μM) 処理において RelA/p65 のリン酸化を抑制し、EZH2 の発現抑制を認めた。

IKK-ε 抑制は細胞増殖へも影響を与え、siRNA 処理、阻害剤 BX795 処理で増殖抑制効果を認めた ($P<0.01$)。臨床検体における *IKBKE*、*EZH2* 遺伝子発現には大腸がん部で同一患者由来の正常大腸粘膜 (n=50) より強い相関 ($r=0.6081$) が見られた。

本研究で大腸がんにおいて IKK-ε を介する NF-κB 経路が EZH2 の過剰発現に寄与していることを見出した。これまでに EZH2 は、メチル化酵素活性に非依存的に遺伝子発現制御を介して発がんに関与する機構も報告されており、EZH2 の発現抑制はがん抑制に有効である可能性が高い。本研究で見出した IKK-ε を標的として EZH2 の発現を制御することが新たながん治療の選択肢の一つとなることが期待される。

(審査の内容)

主査の岡本教授から、本研究の目的、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニング方法の妥当性、結果の統計処理の妥当性など研究の背景、方法、結果、考察に関する 14 項目、第一副査の竹山教授から、PRC1 と PRC2 の働きの違い、NF-κB 経路の阻害と EZH2 の阻害のどちらががん治療に有効であるか等に関する 7 項目、第二副査の近藤教授から、EZH2 の標的遺伝子、EZH2 の阻害剤の臨床応用の現状等 4 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、遺伝子制御学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、大腸がんで EZH2 過剰発現に関与する IKK-ε を同定し、IKK-ε を介する NF-κB 経路が大腸がんにおいて EZH2 発現に重要な経路であることを明らかにした。また EZH2 発現を制御する新たながん治療法の開発に対する妥当性に関する知見を得たもので、臨床的にも意義の高い研究と言える。以上より、本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 岡本 尚

副査 竹山 廣光 近藤 豊